

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-009489

(43)Date of publication of application : 18.01.1985

(51)Int.CI.

C12N 15/00
//(C12N 15/00
C12R 1:02)

(21)Application number : 58-116150

(22)Date of filing : 29.06.1983

(71)Applicant : BEPPU TERUHIKO

(72)Inventor : OKUMURA HAJIME

UOZUMI TAKESHI

BEPPU TERUHIKO

(54) TRANSFORMATION OF ACETIC ACID BACTERIA

(57)Abstract:

PURPOSE: To transform acetic acid bacteria, by introducing plasmid, its fragment, and a chromosome fragment to acetic acid bacteria in a solution containing one or more of an alkali metal, and an alkaline earth metal.

CONSTITUTION: In a solution containing one or more selected from an alkali metal and an alkaline earth metal, plasmid, its fragment, and a chromosome fragment are introduced into acetic acid bacteria collected in a range from middle phase of logarithmic multiplication to the resting phase, so that acetic acid bacteria are transformed. The solution of an alkali metal or an alkaline earth metal contains preferably one metal selected from lithium, rubidium, magnesium, and calcium, especially preferably 1W50mM magnesium and/or 50W100mM calcium. The solution has 6W7pH.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭60-9489

⑫ Int. Cl.
C 12 N 15/00
//(C 12 N 15/00
C 12 R 1:02)

識別記号 庁内整理番号
7115-4B

⑬ 公開 昭和60年(1985)1月18日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 8 頁)

④ 酢酸菌の形質転換方法

⑤ 特 願 昭58-116150
⑥ 出 願 昭58(1983)6月29日
特許法第30条第1項適用 昭和58年3月10日
発行社団法人日本農芸化学会の「日本農芸化学会昭和58年度大会講演要旨集」において発表
⑦ 発明者 奥村一

半田市山崎町8-3
⑧ 発明者 魚住武司
東京都板橋区高島平4-32-8
⑨ 発明者 別府輝彦
東京都杉並区堀の内1-5-21
⑩ 出願人 別府輝彦
東京都杉並区堀の内1-5-21
⑪ 代理人 弁理士 戸田親男

明細書

1. 発明の名称

酢酸菌の形質転換方法

2. 特許請求の範囲

(1) アルカリ金属、アルカリ土類金属から選択された少なくとも1つ以上の金属を含有する溶液中でプラスミド及び/又はプラスミド断片及び/又は染色体断片を酢酸菌に導入することを特徴とする酢酸菌の形質転換方法。

(2) 溶液がリチウム、ルビジウム、マグネシウム、カルシウムから選択された1つを含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の酢酸菌の形質転換方法。

(3) 溶液が、少なくとも、1.0~5.0 mM のマグネシウム及び/または5.0~10.0 mM のカルシウムを含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の酢酸菌の形質転換方法。

(4) 溶液のpHが6~7であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の酢酸菌の形質転換方法。

(5) 酢酸菌が対数増殖中期から静止期初期に集団されたものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の酢酸菌の形質転換方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、酢酸菌の形質転換方法に関するものである。

更に詳細には、本発明は遺伝子関連DNAを導入させて酢酸菌の形質を転換する方法に関するものである。

従来、酢酸菌の形質転換については接合伝達を利用した方法 (Journal of Bacteriology, 145 (1), 358-368, 1981) 以外は全く知られていない状態である。

本発明者らは、酢酸菌において遺伝子操作的に形質転換ができるれば、よりすぐれた酢酸菌が得られるとの発想から脱穀研究を行つたところ、プラスミド、プラスミド断片、染色体断片のすべてにおいて酢酸菌への導入を確認するに至り、本発明を完成することができた。

本発明は、アルカリ金属、アルカリ土類金属か

ら選択された少なくとも1つ以上の金属を含有する溶液中でプラスミド及び/又はプラスミド断片及び/又は染色体断片を酢酸菌に導入することを特徴とする酢酸菌の形質転換方法に関するものである。

本発明において形質転換のために用いられるDNAは、プラスミド、プラスミドの断片、染色体の断片などいずれでもよい。プラスミドとしては菌体から分離されたままのプラスミド、またプラスミドから誘導した各種キメラプラスミド、などいずれも使用することができる。また、プラスミド断片や染色体断片としては前記や機械的処理によつて生成したプラスミド断片などを使用することができる。

また、本発明において形質が転換される酢酸菌としてはアセトバクター属、グルコノバクター属の菌すべてが対象となるが、本発明におけるDNA供給菌及び形質転換菌の例示としてアセトバクター・アセチNa1023が示される。

アセトバクター・アセチNa1023は酢酸発酵

菌から単離されたものであり、後述するプラスミドpTA5001(A)及びプラスミドpTA5001(B)を含んだまま成工側にFERM P-7122として貯蔵されている。

アセトバクター・アセチNa1023は生物学的性質においてバージイ第8版のアセトバクター・アセチの生物学的性質の記載とよく一致し、更に酢酸耐性及びエタノール脱化能を有することで特徴的であり、Acetobacter aceti Na1023 (Aer, Eth⁺⁺)と表示されることもある。

アセトバクター・アセチNa1023は、例えば通常的には下記のYPG培地で培養され、また形質転換株の検出にはYPG培地に抗生素質等の薬剤を適当な濃度となるように、例えばアンビシンを5.0 mg/mlの濃度となるように、添加したもの、または下記の最少培地を用いても培養される。(YPG培地)

イーストエキストラクト	0.5%
ポリペプトン	0.2%
グルコース	3.0%

寒天(固体培地の場合)	2.0%
pH = 6.5	
(最少培地)	
K ₂ HPO ₄	0.01%
KH ₂ PO ₄	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025%
KCB	0.01%
CaC ₂ O ₄ ·2H ₂ O	0.01%
FeC ₂ O ₄ ·6H ₂ O	0.0005%
Na-グルタメート	0.4%
グルコース	3.0%
寒天(固体培地の場合)	2.0%
pH = 6.5	

アセトバクター・アセチNa1023はYPG液体培地で、30℃で24~36時間振とう培養し、培養液を遠心分離処理して細菌される。菌体は緩衝液で十分洗浄し、緩衝液に懸濁され、これにリゾチームが添加され、溶菌される。溶菌液には界面活性剤が添加され、静置後遠心分離し、上清に「⁵²Crラベル

分離し沈殿物を得る。この沈殿物は緩衝液に溶解し、エナジウムプロマイドを加え、更に塩化セシウムを加え、密度を1.57に合わせ、密度勾配遠心分離をおこなう。遠心分離後、遠心テープに紫外線ランプで365 nm の紫外線照射により、染色体バンドの下に出たバンドを分取する。

ここに得られるバンドにはプラスミドpTA5001(A)とプラスミドpTA5001(B)が混在している。

混在する2つのプラスミドは制限酵素による解析の結果、はじめて2種類のほぼ同一分子量のプラスミドの混在物であることが明らかとなつたものである。

プラスミドpTA5001(A)の分子量は23.5 Kbで、制限酵素開裂地図は第1図に示される。

また、プラスミドpTA5001(B)の分子量は22.5 Kbで、制限酵素開裂地図は第2図に示される。

第1図及び第2図に示される略記号の意味は次の通りである。

B : EcoRI : *Escherichia coli* RY 13 細胞の制限酵素

B : SalI : *Streptomyces albus* G 細胞の制限酵素

X : Xba I : *Xanthomonas holeicola* 細胞の制限酵素

プラスミド pTA 5001(A)及びプラスミド pTA 5001(B)はいずれも Xba I によってただ 1ヶ所のみ切断されることによつてきわめて特徴的であつて、この切断部位に他のプラスミド断片や染色体断片を導入し、キメラプラスミドを作成するのがきわめて容易である。

プラスミド pTA 5001(A)及びプラスミド pTA 5001(B)はそれぞれ単独もしくは混在物で酢酸菌ベクターとして使用されるものである。

即ち、プラスミド pTA 5001(A)及び／又はプラスミド pTA 5001(B)にプラスミド断片又は染色体断片を導入したキメラプラスミドは、本発明の形質転換に有効に使用されるものである。

また、親株であるアセトバクター・アセチル

1023、FERM P-7122より100倍／ml濃度のニトロソグアニジン(NTG)変異処理によつて得られたプロリン要求性(Pro⁻)の親株であるアセトバクター・アセチル-8(Ace^r, Btb⁺⁺, Pro⁻)、及びこれから自然変異によつて得た酢酸耐性およびエタノール酸化能が低下欠失し(Ace^{ss}, Btb⁻)、かつ、ストレプトマイシン耐性(Str^r)の菌株であるアセトバクター・アセチル-8081(Ace^{ss}, Btb⁻, Pro⁻, Str^r)などをDNA受容体として、親株を染色体断片の供与体として形質転換を実施することができる。

この場合、染色体断片の調製は、基本的にはプラスミドの調製法に準じて行なわれるが、親株アセトバクター・アセチル-1023の菌体を離過する緩衝液中にはシュクロースが含まれず、また界面活性剤添加後食塩は添加せずに65℃5分間加熱した後エタノール処理、エタノール沈殿、真空乾燥を経て調製されたDNAを、再びプラスミドの調製法の場合と同様にして塩化セシウム-エチジウムプロマイド密度勾配超速心分離にかけ、生

じたDNAバンドを分取する。

ここで得られたDNAバンドは染色体断片及び／又はプラスミド断片を含んでおり、これをそのまま変異株含有液に添加してDNA導入処理を行えば、染色体断片及び／又はプラスミド断片が菌体に入り、変異株菌体内での断片の組み込み乃至は組み換えが起つた時に形質の転換が起ることになる。このようにして親株のプロリン合成遺伝子などが容易に変異株に移入され、形質が転換されるのである。

このように酢酸菌の形質の転換はプラスミド及び／又はプラスミド断片及び／又は染色体断片によつて溶液中に生起させられる。

本発明において、まず、菌体が溶液によつて処理される。ここに用いる溶液としては、アルカリ金構、アルカリ土類金構から選択された1つを含有する塩溶液であるのが好ましい。例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、マグネシウム、カリウムの複化物があげられる。

塩化カルシウムでは50～100mM、塩化マ

グネシウムでは10～50mM程度で、pHを6～7の微酸性にしておいてこれに形質転換すべき菌体を浸漬処理するのがよい。

また、形質転換すべき菌体は、対数増殖期中期から静止期初期にかけて集菌されたものを用いるのがよい。

溶液によつて処理された菌体には、溶液に浸漬された状態で、プラスミド及び／又はプラスミド断片及び／又は染色体断片が溶液で溶解で添加される。

DNAの導入は0℃で約1.5時間ゆるやかに搅拌し完了する。

DNAの導入処理の完了した菌体は最少培地(固体)または抗生物質等の薬剤を適当な濃度となるよう、例えばアンピシリンを50μg/mlの濃度となるように、添加したYPD培地(固体)で30℃、5～10日間培養し、コロニーを分離する。

得られた菌体の形質を確認したところ、存在しなかつた各種形質が導入されているのが分る。

形質転換に際しては、プラスミドもしくはキメラプラスミドの場合は細胞にとりこまれてそのまま

6,000× \varnothing で、5分間遠心分離し、集菌する。

菌体には0.004倍容量の上記CaCl₂溶液を添加し、DNA受容菌体懸濁液とした。

実施例2 プラスミドpTA 5001(A)とプラスミドpTA 5001(B)の混在物の単離

アセトバクター・アセチNa1023(Ace^r, Eth⁺⁺, pro⁺, str^s)、PERM P-7122からNTG変異処理及び自然変異処理によつて分離されたアセトバクター・アセチ10-808.1(Ace^{ss}, Eth⁻, pro⁻, str^r)を500mL坂口フラスコに入れた100mLYPD液体培地に接種し、30℃で20時間振とう培養した。

培養液は0℃で、6,000× \varnothing で、10分間遠心分離し、集菌する。菌体は100mM NaCl及び5mM MgCl₂を含有する5mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)の0.5倍容量で2回洗浄する。再び0℃で、6,000× \varnothing で、5分間遠心分離し、集菌する。

この菌体には0.4倍容量のCaCl₂溶液(100mM CaCl₂、250mM KCl、5mM MgCl₂、5mM Tris-HCl、pH 7.6)が加えられ、0℃で、

その後新らしいYPD培地40mLで植え継ぎさらに30℃で56時間振とう培養した。

銀鏡後、TE緩衝液(20mM EDTA、50mMトリス塩酸、pH 8.0)で2回菌体を洗浄した。

得られた菌固体2gあたり7mLのTBS緩衝液(50mMトリス塩酸、20mM EDTA、25%ショ糖、pH 8.0)を加え、菌体を懸濁し、4%のリゾチーム液(0.25Mトリス塩酸、リゾチーム2%、pH 8.0)をさらに加え、0℃で5分静置した。次に0.25M EDTA液(pH 8.0)を4mL加え、0℃で5分静置した後、37℃で20分間反応させた。反応後、3mLの10%ラウリル硫酸ナ

トリウムを加え、37℃で20分間静置後、5mLの5M食塩水を加え、0℃で一夜静置した。4,800× \varnothing で60分間遠心分離をかけ、上清を分取した。次にこの上清に最終濃度で10%になるようにポリエチレングリコール6,000を加え、4℃で一夜静置した後、3,000× \varnothing で10分間遠心分離し、沈殿物を得た。この沈殿物を7mLのUC緩衝液(50mMトリス塩酸、5mM EDTA、50mM NaCl、pH 7.8)に溶解させた後、最終濃度で500μg/mLになるようにエチジウムプロマイドを加え、さらに塩化セシウムを加えて密度を1.57に合わせた。この溶液を15℃、10,000× \varnothing で40時間密度勾配遠心分離をおこなつた。遠心分離後、遠心チューブに紫外線ランプで365nmの紫外線を照射することにより、染色体バンドの下にあらわれるバンドをプラスミド分離として分取した。次いで分画液をインプロペノールで処理し、エチジウムプロマイドを除去した後、TE緩衝液(10mMトリス塩酸、1mM EDTA、pH 7.5)に対して透析した。これをプラ

スミド混在溶液とした。

得られたプラスミド混在溶液中には2つの環状プラスミドが混在しており、制限酵素による解析の結果、第1図に示すプラスミドpTA 5001(A)と第2図に示すプラスミドpTA 5001(B)であることが明らかとなつた。

すなわち前記で調製したプラスミド混在溶液に対し、少なくとも5倍量過剰の制限酵素(EcoRIおよびSalIは宝酒造社製、XbaIは、ベセスダ・リサーチ社製を使用した。)を常法に従がつて各々の制限酵素の至適条件下で反応させた。反応後、垂直型アガロースゲル電気泳動で分析した。即ち、1%アガロースゲルを用い、トリス酢酸緩衝液(40mMトリス、20mM酢酸、2mM EDTA、pH 8.1)中で泳動させた。その後、ゲルをエチジウムプロマイドの1μg/mL液に没して染色した。このゲルに紫外線を照射し、生成断片の数を判定し、各断片の泳動距離から、各々の分子量を算出した。分子量は、同一アガロース上で同時に泳動したラムダファージDNAのHind III切断で生成

する分子量既知の各断片の泳動距離から作成した標準線をもとに算出した。

各制限酵素を单独で用いて得られた各断片及び各制限酵素の2種以上を組合せて用いた処理によつて得られた各断片の断片数及び分子量などから pTA 5001(A) 及び pTA 5001(B) の第1回及び第2回に示した制限酵素断片地図が決定された。

実施例5 プラスミド pTA 5001(A)とプラスミド pTA 5001(B)の混在物のベクターとしての利用

実施例2で得られたプラスミド混在溶液(DNA量 1.0 μg)中に、大腸菌薬剤耐性ベクターである pACYC 177 (カナマイシン耐性及びアンピシリン耐性; *Journal of Bacteriology*, 134 (3), 1141-1156, 1978)を持つ大腸菌 (*Escherichia coli* C600) から得たプラスミド pACYC 177 (第3図に示す。DNA量 2.0 μg) を添加し、少なくとも5倍量過剰の制限酵素 *Xba*I を常法により適当条件下で反応させ、反

応終了後、等量のエタノールを加え激しく搅拌して制限酵素を失活させた後、さらにエーテル抽出を充分行なつてエタノールを除去し、さらに2倍量のエタノールを加えて -80°C に1時間保持した後、15,000× φ で5分間遠心分離を行なつて DNA を沈降させ、さらに真空乾燥してエタノールを除去した後、次に沈殿を水に溶解後、常法によつて、T4 DNAリガーゼによる反応を 21°C で2時間行ない、さらに前記と同様にしてエタノール沈殿、真空乾燥を行なつて得られた沈殿を TB緩衝液 0.1 ml に溶解してキメラプラスミド含有溶液を得た。

それぞれのキメラプラスミドはいずれもプラスミド pACYC 177 を含有している。しかし、プラスミド pACYC 177 のカナマイシン耐性部位に *Xba*I 切断点があつて、そこが切断されているためにカナマイシン耐性は発現せず、アンピシリン耐性のみが発現することになる。

実施例4 染色体断片溶液の調製

実施例2に示した方法において TBS 緩衝液の

代わりに TB 緩衝液を用いて調製した 5M 食塩水を加える前の透明液を 65°C で 5 分間加熱し、さらに滅菌水を 3 倍量加えた後、それと等量の水飽和エタノールを加えて激しく搅拌後 7,000× φ 10 分間の遠心を行なつてエタノールを分離し、エタノール上層の水溶液層を分取し、分取した水溶液の 2 倍量のエタノールを加えて -80°C 2 時間放置後 7,000× φ 30 分間の遠心を行ない、得られた沈殿を真空乾燥した後、UC 緩衝液に溶解して、以下再び実施例2と同様にして塩化セシウム-エチジウムプロマイド密度遠心分離によつて得られた DNA バンドを分取し、エチジウムプロマイドを除去した後、TB 緩衝液に対して透析することによつて染色体断片溶液を得た。

染色体断片溶液には染色体断片及びプラスミド断片が混在しており、形質転換の際は適宜、希釈あるいは濃縮もしくはそのまま使用された。

実施例5 キメラプラスミドを用いた形質転換

実施例1で得た DNA 受容細胞懸濁液 1.2 ml を用意し、これに実施例3で得たキメラプラスミド

含有溶液 1.0 ml を添加し、0°C で 90 分間ゆるやかに搅拌しつつ、キメラプラスミドの直接導入を行なつた。

ここに得られたキメラプラスミド導入細胞を含む液を 3 ml の YPG 培地に移し、30°C 6 時間振とう培養を行なつた後、アンピシリントリプトアミド添加した YPG 培地 (固体) 上で 30°C で 5 日間培養し、9 株のコロニーを得た。これらを 10-8081-A1-A9 と命名した。このうち、10-8081-A1-A1 をアンピシリントリプトアミド添加した YPG 液体培地で 30°C、24 時間振とう培養し、実施例2の方法に従つてプラスミドを分離したところ、プラスミド pTA 5001(A) とプラスミド pTA 5001(B) の混在物以外にこれらよりやや分子量の大きいプラスミドが得られた。このプラスミドは先に導入したキメラプラスミドのうち、pTA 5001(A) と pACYC 177 が *Xba*I 切断部位を介して連結したキメラプラスミドと認められた。また、アセトバクター・アセチル-8081 はアンピシリントリプトアミド添加した YPG 液体培地で 30°C、24 時間振とう培養した結果、コロニーが得られなかった。

が10-8081-A1はアンピシリン耐性を持つていることなどからもキメラプラスミドが導入され、形質転換が行なわれたことが確認された。

同様にして、少なくとも10-8081-A2～-A6はpTA5001(回)とpACYC177が制限酵素XbaI切断部位を介して連結したキメラプラスミドが導入されていることが確認された。

また10-8081-A1～-A6の持つキメラプラスミドを再度10-8081に前記と同様の方法で導入したところ、10-8081-A1～-A6の各キメラプラスミドにおいて、1μg DNA量当たりに換算して10⁵個前後のアンピシリン耐性の形質転換株が得られた。

実施例6 染色体断片を用いた形質転換

実施例1で得たアセトバクター・アセチ10-8081(Ace^{RE}, Rth⁻, Pro⁺, Str^R)のDNA受容細胞懸濁液0.2mlを用意し、これに実施例4で得たアセトバクター・アセチNa1023(Ace^R, Rth⁺⁺)の染色体断片溶液0.1mlを添加し、0℃で50分間ゆるやかに搅拌し、次いでこの反応液

及び/又はプラスミド断片の導入が行なわれ、形質転換が起つたことが分る。

得られた形質転換株はすべてプロリンを要求しなくなつたアセトバクター・アセチ10-8081(Ace^{RE}, Rth⁻, pro⁺, str^R)であつた。

実施例7

実施例6における42℃、3分間のヒートショックを行つた場合と、行なわない場合を比較した。処理方法は実施例4と全く同様である。

その結果は次の表に示される。

表

ヒートショック	+	-	+
全DNA(80μg)	+	+	-
最少培地のコロニー数	1131	1056	6

この表から、この条件では、ヒートショックの影響はほとんど認められなかつた。

実施例8

有効細胞の懸濁液の塩浴液を100mMのリチ

を42℃で3分間ヒートショックし、更に0℃で60分間ゆるやかに搅拌し、DNAの導入を行なつた。

反応物は最少培地(固体、ストレプトマイシン50μg/ml添加)で30℃、7～10日間培養し、生育したコロニーを検出した。

対照として、DNAを含まない同一懸濁液を添加し、同様の処理をし、同一培地で同様に培養し、生育したコロニーを検出した。また、DNA受容細胞を添加しない場合も対照とした。

その結果は次の表に示される。

表

DNA受容細胞	+	+	+	-
全DNA(μg)	80	8	0	80
最少培地のコロニー数	1515	291	2	0

上表から明らかのように、溶液中で染色体断片

ウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、マグネシウム、カルシウムの各塩化物に競きかえる以外はすべて実施例6と同じに形質転換を行い、コロニーを検出した。

その結果は次の表に示される。

表

	形質転換率(%)	培地	対照 (実施例 6のまま)	NaCl ₂	KCl ₂	RbCl ₂	CsCl ₂	MgCl ₂	CaCl ₂
	100		117	15	45	83	28	70	121

種々のアルカリ金属、アルカリ土類金属が有効であり、なかでもリチウム、ルビジウム、マグネシウム、カルシウムがより良い効果を示した。

実施例 9

有効細胞の懸濁液の塩溶液を NaCl₂、KCl₂、MgCl₂、CsCl₂において濃度を変化させる以外はすべて実施例 6 と同じに形質転換を行い、コロニーを検出した。

その結果は第 4 図に示される。

第 4 図からマグネシウムの場合は 1.0 ~ 5.0 mM、カルシウムの場合は 5.0 ~ 10.0 mM、ナトリウムとカリウムの場合は 10.0 mM 以上が好ましいことが分る。

実施例 10

有効細胞の懸濁液の塩溶液に pH 6.0 ~ 9.5 の塩化カルシウム 1.00 mM 溶液を使用する以外はすべて実施例 6 と同じに形質転換を行い、コロニーを検出した。

その結果は第 5 図に示される。

第 5 図から塩化カルシウム 1.00 mM 溶液の pH

は酸性側に高い活性があることが分る。

実施例 11

有効細胞の培養液からの採取を培養全期間の各時期で行う以外はすべて実施例 6 と同じに形質転換を行い、コロニーを検出した。

その結果は第 6 図に示される。

第 6 図から対数増殖期中期から静止期初期にかけて発生されたものが形質転換率においてすぐれているのが分る。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図はプラスミド pTA 5001 (W) の制限酵素開裂地図を示し、第 2 図はプラスミド pTA 5001 (B) の制限酵素開裂地図を示し、第 3 図はプラスミド pACYC 177 の制限酵素開裂地図を示す。

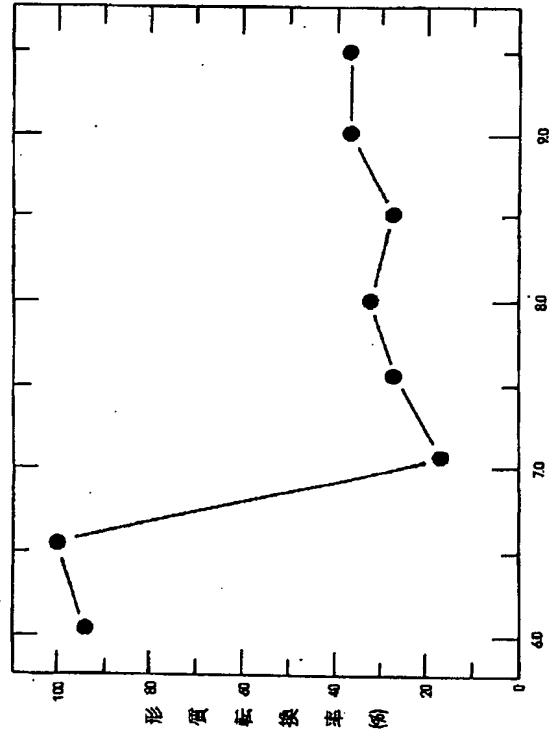
B … EcoRI による切断部位、S … SalI による切断部位、X … XbaI による切断部位、Km … カナマイシン耐性遺伝子、Am … アンピシリン耐性遺伝子。

第 4 図は、実施例 9 における、各種塩の濃度変化と形質転換率の関係を示すグラフであり、第 5

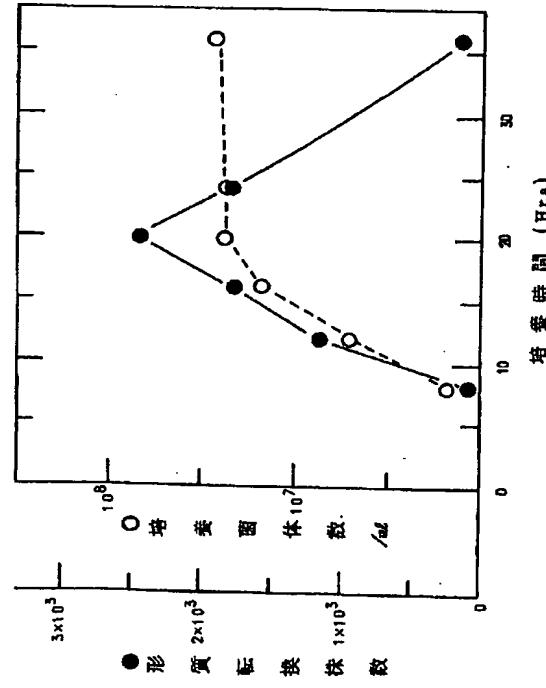
図は、実施例 10 における、塩化カルシウム溶液の pH の変化と形質転換率の関係を示すグラフであり、第 6 図は、実施例 11 における、有効細胞の採取時期と形質転換率の関係を示すグラフである。

代理人弁理士 戸田 親男

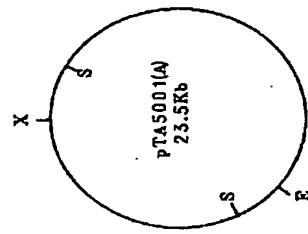
第 5 図



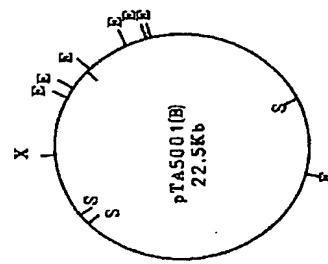
第 6 図



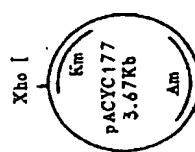
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

